

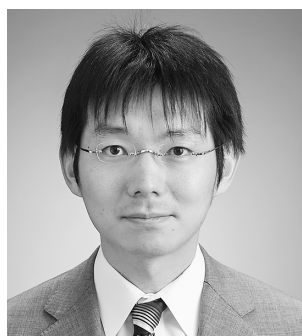
受賞対象論文

Nosaka N, Yashiro M, Yamada M, Fujii Y, Tsukahara H, Liu K, Nishibori M, Matsukawa A, Morishima T : Anti-high mobility group box-1 monoclonal antibody treatment provides protection against influenza A virus (H1N1)-induced pneumonia in mice. Crit Care (2015) 19, 249.

野坂 宜之
Nobuyuki Nosaka

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 小児医科学,
岡山大学病院 高度救命救急センター

Department of Pediatrics, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Advanced Emergency and Critical Care Medical Center, Okayama University Hospital



<プロフィール>

昭和57年生まれ

平成18年3月 名古屋大学医学部医学科卒業
平成18年4月 トヨタ記念病院 統合診療科 初期研修医
平成20年4月 トヨタ記念病院 小児科 後期研修医
平成22年4月 国立成育医療研究センター 集中治療科 レジデント
平成23年10月 国立成育医療研究センター 集中治療科 フェロー
平成25年4月 岡山大学病院 高度救命救急センター 助教
平成26年4月 岡山大学病院 小児科 医員
平成28年3月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科博士課程修了
平成28年5月 岡山大学病院 高度救命救急センター 助教
現在に至る

研究の背景と経緯

岡山大学小児科学教室・感染免疫グループは、森島恒雄前教授の指導のもと重症のインフルエンザによる肺炎・脳症の疫学・病態解析・診断・治療に関する研究を十年來続けてきた¹⁻⁶⁾。2009年のパンデミック以後も人類は高病原性インフルエンザの脅威に晒され、特に重症肺炎・ARDSに対する対策は世界的な課題になっている。近年の抗インフルエンザウイルス薬の開発は目覚ましいが、すでにそれに対して不応あるいは耐性のインフルエンザウイルスが出現している。重症インフルエンザ感染症に対する新規治療薬の開発は当教室の一つの研究テーマになった。

重症インフルエンザ感染症の病態にはサイトカインを始めとする過剰な炎症メディエーターが関与しており、抗ウイルス治療に加え炎症メディエーター（サイトカイン・酸化ストレスなど）の抑制も重要な治療戦略である。我々は後者に着目し、2013年には当教室の八代らが、抗炎症・抗酸化作用を有するタンパク質であるチオレドキシン-1 がマウスインフルエンザ肺炎に対し治療的効果を発揮することを証明し発表した⁶⁾。

重症インフルエンザ感染症の病態解析が進む中で、

その肺炎・脳症の病態に HMGB-1 (high mobility group box-1) という炎症メディエーターが強く関与する可能性が相次いで報告された^{7,8)}。HMGB-1 は核内に局在し遺伝子転写制御やクロマチン構造の維持、DNA 修復に機能する非ヒストンタンパク質として発見されたが、最近には殊にその炎症性メディエーターとしての機能に注目が集まり、敗血症などの急性疾患から悪性腫瘍などの慢性疾患に至る幅広い炎症病態への関与が報告されている。感染などにより活性化されたマクロファージ／単球から HMGB-1 は能動的に細胞外へ放出され、RAGE(receptor for advanced glycation endproducts) など免疫細胞上の受容体に結合し炎症を増幅することが知られている。

この HMGB-1 を治療標的とした抗体治療の研究が、西堀正洋教授が主催される当学薬理学教室から発表されていた。その抗体は HMGB-1 の acid tail を特異的に認識し中和するモノクローナル抗体であり、ラットの脳梗塞や頭部外傷モデルで劇的な治療効果を認めていた^{9,10)}。そこで我々は共同で、この抗 HMGB-1 モノクローナル抗体の重症インフルエンザ肺炎に対する治療効果について検証することにした¹¹⁾。

研究成果の内容

8～9週齢のC57/BL6マウスにインフルエンザウイルス A/Puerto Rico/8/34株 (H1N1) (1.0×10^2 PFU) を経鼻接種し、接種後1, 24, 48時間後に抗 HMGB-1 モノクローナル抗体または class-matched control 抗体 (各 2 mg/kg/回) を尾静脈投与した。

1. 抗 HMGB-1 抗体は肺のウイルス増殖は抑制せずに生存率を改善した

まず我々は生存率の解析をした。その結果、抗 HMGB-1 モノクローナル抗体は50%致死のH1N1感染において生存率を有意に改善させた (生存率抗 HMGB-1 モノクローナル抗体群: control 群=93.3%: 46.7%, 各群 n = 15, $p < 0.01$)。肺組織中のH1N1定量を感染3, 5, 7, 10日後に施行したところ、興味深いことに抗 HMGB-1 モノクローナル抗体は肺でのインフルエンザウイルスの増殖は抑制しなかった。

2. 抗 HMGB-1 抗体は抗炎症・抗酸化作用により肺障害を抑制した

次に、上記と同じスケジュールで気管支肺胞洗浄液 (BALF) ならびに肺組織を採取した。抗 HMGB-1 モノクローナル抗体は肺病理組織像を改善した。BALF 中の好中球数を測定すると、抗 HMGB-1 モノクローナル抗体はH1N1感染による好中球数の増加を

抑制した。つづいて、BALF 中の $\text{TNF-}\alpha$, IL-6, CXCL-1 を測定した。 $\text{TNF-}\alpha$ と IL-6 は重症インフルエンザ肺炎の病態形成に関与する炎症性サイトカインであり、CXCL-1 は好中球遊走に関与するケモカインである。いずれのサイトカイン・ケモカインも H1N1 感染で上昇した。しかし、抗 HMGB-1 モノクローナル抗体はこれらの上昇を有意に抑制した。さらに、我々は血清中の酸化ストレスマーカーを定量した。H1N1 感染マウスでは血清中のヒドロペルオキシド濃度が上昇した。しかし、抗 HMGB-1 モノクローナル抗体はこれを有意に抑制した。

3. 抗 HMGB-1 抗体は肺における RAGE の発現・産生を抑制した

HMGB-1 とその受容体である RAGE は互いにポジティブ・フィードバックを受ける関係にある。我々は肺組織の RAGE の発現量と、BALF 中の可溶性 RAGE 濃度を測定した。H1N1 感染において、RAGE の発現・産生は増加する。しかし、抗 HMGB-1 モノクローナル抗体はこれを有意に抑制した。

以上の結果から、抗 HMGB-1 モノクローナル抗体は HMGB-1 を中和することで免疫細胞上の RAGE の発現・産生を抑制し、その結果 $\text{TNF-}\alpha$ などのサイトカインや酸化ストレスを抑制し、肺障害を軽減することで生存率を改善させたと考えられる (図)。

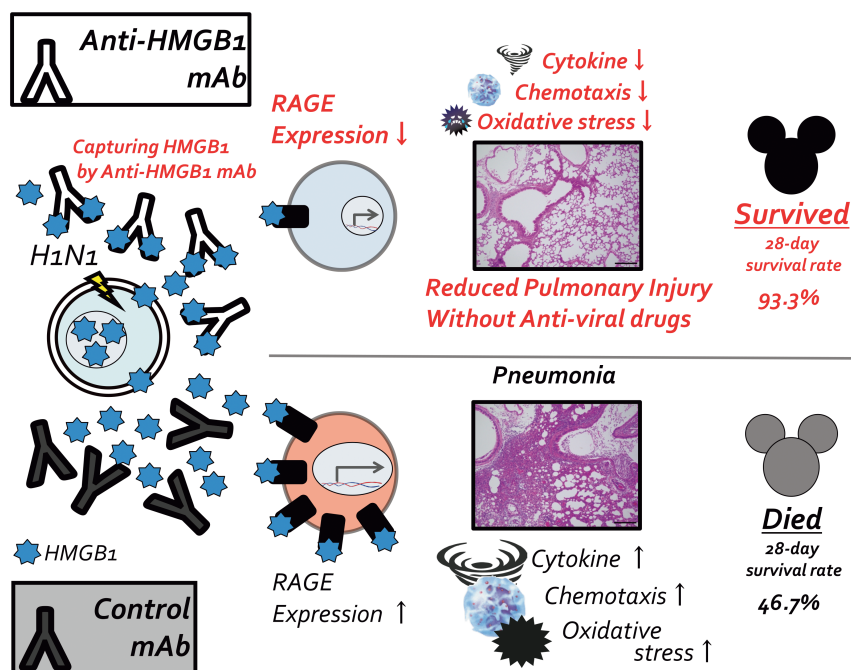


図 抗 HMGB-1 モノクローナル抗体の重症インフルエンザ肺炎に対する効果

研究成果の意義

2009年に発生したインフルエンザ・パンデミックでは、ウイルスの病原性は比較的弱かったものの、小児を中心に集中治療を要する重症呼吸不全患者が多発した。近い将来再び発生しうるインフルエンザ・パンデミックに向け、公衆衛生、診断、治療、搬送など医療のさまざまな側面において対策を講じておく必要がある。特に治療の側面においては、抗ウイルス薬をサポートする複数の選択肢を準備しておくことが重要と考えられる。本研究は HMGB-1 が重症インフルエンザ肺炎の治療標的になり、抗 HMGB-1 モノクローナル抗体がその治療薬になる可能性を示した。インフルエンザ感染症における炎症メディエーターを標的とした治療戦略が有効であることを示唆している。また、げっ歯類とヒトの HMGB-1 のアミノ酸配列は99% 相同であり、この研究の結果は十分にヒトにも応用できると考えられる。さらに、既にヒト化抗 HMGB-1 モノクローナル抗体の開発も進んでおり、ヒトへの臨床応用は目前の段階にある。

本研究では、抗ウイルス薬を使うことなく、抗 HMGB-1 モノクローナル抗体が単独で50% 致死の重症インフルエンザ肺炎を改善させた。SARS コロナウイルスやウエストナイルウイルス、デングウイルスなどの新興・再興感染症の病態にも HMGB-1 の関与が報告されている。抗ウイルス薬が存在しない重症ウイルス感染症においても抗 HMGB-1 モノクローナル抗体が治療薬として応用できる可能性を示唆している。

今後の展開や展望

今後の臨床応用ならびに抗ウイルス薬耐性のインフルエンザ感染症を意識して、既存の抗インフルエンザ薬と抗 HMGB-1 モノクローナル抗体の併用効果を明らかにすべく研究を進めている。また、インフルエンザウイルス関連脳症など、インフルエンザによる他の重症病態における抗 HMGB-1 モノクローナル抗体の治療効果を検証したい。

重症インフルエンザ患者は明日発生するかもしれない。HMGB-1 が治療標的になることが示された現時点で、実際に利用可能な医療資源で HMGB-1 を制御する戦略を準備することも重要である。本研究では抗体による HMGB-1 の「中和作用」の有効性を示した。

実臨床では HMGB-1 吸着能が高い血液濾過器 (AN69ST 膜など) が使用されている。したがって、HMGB-1 の「除去」も一つの治療選択肢として現在利用可能であり、今後重症インフルエンザ感染症におけるその評価が期待される¹²⁾。今後も繰り返し発生するインフルエンザの大流行から次の世代を守るためにも、さまざまな治療選択肢を準備しておくことが重要であると考えている。

文 献

- 1) Nagao T, Morishima T, Kimura H, Yokota S, Yamashita N, Ichiyama T, Kurihara M, Miyazaki C, Okabe N: Prognostic factors in influenza-associated encephalopathy. *Pediatr Infect Dis J* (2008) 27, 384-389.
- 2) Tsuge M, Yasui K, Ichiyama T, Saito Y, Nagaoka Y, Yashiro M, Yamashita N, Morishima T: Increase of tumor necrosis factor-alpha in the blood induces early activation of matrix metalloproteinase-9 in the brain. *Microbiol Immunol* (2010) 54, 417-424.
- 3) Yamashita N, Tsukahara H, Tsuge M, Nagaoka Y, Yashiro M, Saito Y, Fujii Y, Oka T, Morishima T: Pathogenic mechanisms of influenza A(H1N1)pdm09 infection elucidated on gene expression profiling. *Pediatr Int* (2013) 55, 572-577.
- 4) Tsuge M, Oka T, Yamashita N, Saito Y, Fujii Y, Nagaoka Y, Yashiro M, Tsukahara H, Morishima T: Gene expression analysis in children with complex seizures due to influenza A(H1N1)pdm09 or rotavirus gastroenteritis. *J Neurovirol* (2014) 20, 73-84.
- 5) Saito Y, Fujii Y, Yashiro M, Tsuge M, Nosaka N, Yamashita N, Yamada M, Tsukahara H, Morishima T: Inhibitory Effects of Edaravone, a Free Radical Scavenger, on Cytokine-induced Hyperpermeability of Human Pulmonary Microvascular Endothelial Cells: A Comparison with Dexamethasone and Nitric Oxide Synthase Inhibitor. *Acta Med Okayama* (2015) 69, 279-290.
- 6) Yashiro M, Tsukahara H, Matsukawa A, Yamada M, Fujii Y, Nagaoka Y, Tsuge M, Yamashita N, Ito T, Yamada M, Masutani H, Yodoi J, et al.: Redox-active protein thioredoxin-1 administration ameliorates influenza A virus (H1N1)-induced acute lung injury in mice. *Crit Care Med* (2013) 41, 171-181.
- 7) Ito Y, Torii Y, Ohta R, Imai M, Hara S, Kawano Y, Matsubayashi T, Inui A, Yoshikawa T, Nishimura N, Ozaki T, Morishima T, et al.: Increased levels of cytokines and high-mobility group box 1 are associated with the development of severe pneumonia, but not acute encephalopathy, in 2009 H1N1 influenza-infected children. *Cytokine* (2011) 56, 180-187.
- 8) Momonaka H, Hasegawa S, Matsushige T, Inoue H, Kajimoto M, Okada S, Nakatsuka K, Morishima T, Ichiyama T:

High mobility group box 1 in patients with 2009 pandemic H1N1 influenza-associated encephalopathy. *Brain Dev* (2014) 36, 484-488.

- 9) Liu K, Mori S, Takahashi HK, Tomono Y, Wake H, Kanke T, Sato Y, Hiraga N, Adachi N, Yoshino T, Nishibori M : Anti-high mobility group box 1 monoclonal antibody ameliorates brain infarction induced by transient ischemia in rats. *FASEB J* (2007) 21, 3904-3916.
- 10) Okuma Y, Liu K, Wake H, Zhang J, Maruo T, Date I, Yoshino T, Ohtsuka A, Otani N, Tomura S, Shima K, Yamamoto Y, et al. : Anti-high mobility group box1 antibody therapy for traumatic brain injury. *Ann Neurol* (2012) 72, 373-384.
- 11) Nosaka N, Yashiro M, Yamada M, Fujii Y, Tsukahara H,

Liu K, Nishibori M, Matsukawa A, Morishima T : Anti-high mobility group box-1 monoclonal antibody treatment provides protection against influenza A virus (H1N1)-induced pneumonia in mice. *Crit Care* (2015) 19, 249.

- 12) Honore PM, Jacobs R, Hendrickx I, De Waele E, Van Gorp V, Spapen HD : To counteract or to clear high-mobility group box-1 protein in influenza A (H1N1) infection? That may become the question. *Crit Care* (2015) 19, 401.

平成28年 8 月受理

〒700-8558 岡山市北区鹿田町 2 - 5 - 1

電話 : 086-235-7249 FAX : 086-221-4745

E-mail : pv702xz5@s.okayama-u.ac.jp